

**Espacenet**

Bibliographic data: JP 55156592 (A)

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* GENTAMICIN C1A

Publication date: 1980-12-05
Inventor(s): FUJII TADAYO; SATO SHIYUUZOU; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU ‡
Applicant(s): TOYO JOZO KK ‡
Classification: [†] **A61K36/74; C12P1/06; C12R1/01; (IPC1-7): C12P1/06; C12R1/01**
- European:
Application number: JP19790060021 19790515
Priority number(s): JP19790060021 19790515
Also published as: • JP 61022855 (B)
• JP 1395899 (C)

Abstract of JP 55156592 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, gentamicin C1a, by culturing gentamicin C1a-producing fungi belonging to *Dactylosporangium* genus. CONSTITUTION: Fungi capable of producing an antibiotic substance, gentamicin C1a, and belonging to *Dactylosporangium* genus, e.g. *Dactylosporangium thailandense* G367, etc. are cultured in a conventional culturing medium at 25-35 deg.C for 100-200hr under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the eluate is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin. The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, gentamicin C1a.

Last updated: 04.04.2011 Worldwide Database 5.7.20; 92p

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑮ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭55-156592

⑯ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
// C 12 R 1/01

識別記号

府内整理番号
6760-4B

⑯ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑯ 抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

静岡県田方郡大仁町三福685

⑯ 特願 昭54-60021

⑯ 発明者 児玉章

⑯ 出願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の

3

⑯ 発明者 藤井忠代

⑯ 発明者 小谷勝

三島市光ヶ丘15の4

静岡県田方郡大仁町田京727の

3

⑯ 発明者 里井秀三

⑯ 出願人 東洋醸造株式会社

静岡県田方郡函南町柏谷1277の

静岡県田方郡大仁町三福632の

28

1

⑯ 発明者 武藤直紀

明細書

1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グタチロスピオランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンClaを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

(2) グタチロスピオランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌が、グタチロスピオランジウム・タイランデンセ G 367 である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンCla (Gentamicin Cla) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンCla生産菌としては、ミクロモノスボラ・ブルプレア (Micromonospora purpurea; 特公昭44-21594号、

米国特許第3091572号、Antimicrob-agents and chemother. 1963 1, 8, 14, 17 および 116)、ミクロモノスボラ・エチノスボラ (Micromonospora echinocpora) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスボラ・サガミエンシス (Micromonospora sagamienensis) およびその2変種 (特開昭49-42888号)、およびミクロモノスボラ・ブルプレア・バリエスター・エグレッセンス (Micromonospora purpurea var. nigrescens) ハンガリー国特許第168778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンCla生産菌は、すべてミクロモノスボラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌系に一価づつ胞子を形成するものであり、さらにミクロモノスボラ属はミクロモノスボラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであつた (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の畑土壌より分離

した放酵菌 G 3 6 7 株が抗生素質ゲンタミシン C 1a を產生することを見い出し、後述する通り、放酵菌 G 3 6 7 株がダクチロスボランジウム属 (*Dactylosporangium*) に属するもので、その形態的性状は基生菌系に胞子のうを產生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクチロスボランジウム属はアクチノプラネス科 (*Actinoplanaceae*) に属するもので、従来のミクロモノスボラ属とは分類学上、明らかに科の段階での相違が認められるもので、抗生素質ゲンタミシン C 1a の新規な生産菌であるとを見い出した。

また上記の放酵菌 G 3 6 7 株の菌学的諸性状は次の通りである。

(I) 形態的性状

リソグ酸カルシウム寒天培地 [*Bact. Rev.* 2.1 : 1 (1957)] 上、30°C、3~7日間培養し、観察した所見は次の通りである。

基生菌系は曲線状または屈曲状で、分枝をなして伸長し、分断はせず、直徑 0.5~0.8 μ であり、

— 3 —

氣菌糸は形成しない。

基生菌系に、大きさ $1.5 \times 2.0 \times 2.5 \mu$ の球状または橢円状物体の產生が、寒天培地中に埋つた状態でみられる。

基生菌系より短かい胞子のう柄を生じ、胞子のうは指形で、寒天培地表面上に、1個または房状に形成する。胞子のうの大きさは、 $1.0 \times 1.5 \times 4.0 \sim 6.5 \mu$ で、中に 3~4 個の胞子がたてに一列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、橢円形または洋梨形を呈し、大きさは $1.0 \sim 1.5 \times 1.5 \sim 2.5 \mu$ であり、極性で房状の鞭毛を有している。

(II) ジアミノビメリン酸組成

全園体分析によるジアミノビメリン酸は、メグー型およびメゾー型より R m 値の低いもの (slow moving diaminopimelic acid) が検出された。

(III) 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30°C、14日間培養し、観察した所見は次表の通りであり、オート・ミール寒天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される

— 4 —

以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリソグ酸カルシウム寒天培地上で良好、土壌寒天培地 [*Jgen. Microbiol.* 5.0 : 295 (1968)] 上で、中程度であり、その他の培地上ではわずか、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラーハーモニー・マニアル (*Color Harmony Manual*) 第4版 1958年 (*Container Corporation of America*) による色の分類に従つたものである。

— 5 —

各種培地上における生育状態等

培地	生育	基生菌糸の色	可溶性色素
シユクロース・硝酸塩寒天培地 (ワックスマン培地No.1)※	中程度ないし不良	アーピコット [Apricot (4ia)] ないしダスティ・オレンジ [Dusty Orange (4ic)]	なし
グルコース・アスパラギン寒天培地 (ワックスマン培地No.2)※	不 良	ブライト・メロン・イエロー [Brilliant Melon Yellow (3ia)] ないしアーピコット (4ia)。	"
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP培地5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー [Light Melon Yellow (3ea)]	"
スター・無糖寒天培地 (ISP培地4)※※	中程度ないし良好	ルセット・オレンジ [Russet Orange (4nc)] ないし ダスティ・オレンジ (4ic)	"
チロシン寒天培地 (ISP培地7)※※	僅少ないし不良	アーピコット [Apricot (4ga)] ないしペール・パステル オレンジ [pale Pastel Orange (4ic)]	"
オート・ミール寒天培地 (ISP培地5)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ルスト [Orange Rust (4pe)] ないし ルセットオレンジ [Russet Orange (4pc)]	"
イースト・コス・要芽エキス寒天培地 (ISP培地2)※※	"	メイプル [Maple (4ie)] ないしルゲッジ・タン [Luggage Tan (4ne)]	メイプル (4ie) ないしライト・ ブラウン [Light Brown (4ng)]
リンゴ酸カルシウム寒天培地	不 良	無 色	なし
栄養寒天培地 (ワックスマン培地No.14)※	僅 少	"	"

- 6 -

ベネット寒天培地 (ワックスマン培地No.30)※	中程度ないし良好	メイプル (4ie) ないしルゲッジ・タン (4ne)	メイプル (4ie) ないしライト・ブラウン (4ng)
エマーソン寒天培地 (ワックスマン培地No.28)※	中 程 度	パステル・オレンジ (4ic) ないしメイプル (4ie)	メイプル (4ie)
ハイキー・トレヌー寒天培地 (ワックスマン培地No.32)※	中程度ないし良好	シナモン [Cinnamon (3ia)] ないしメイプル (4ie)	メイプル (4ie) ないしライト・スパイス ・ブラウン [Light Spice Brown (4ig)]
グルコース・イースト・エキス寒天 培地 (ワックスマン培地No.29)※	中 程 度	メロン・イエロー [Melon Yellow (3gu)]	なし
ペプトン・イースト・エキス寒天 培地 (ISP培地6)※※	僅 少	無 色	"
土壤寒天培地	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワックスマン培地No.40)※	中 程 度	タイルレッド [Tile Red (5nc)] ないしカッパー [Copper (5ic)]	"
ジャガイモ片+炭酸カルシウム	"	"	"
ニンジン片	僅 少	無 色	"

※ Waksman, S. A: The Actinomycetes Vol. 2 1961 p. 327-334 Williams & Wilkins co.

※※ Inter. J. Syst. Bact. 16: 313~340 (1966)

※※※ Antimicrob. Agents and Chemother. 1963 p. 116~124

- 7 -

〔N〕 生理的性状

生理的諸性状は下記の通りである。

1) 炭素源の資化性

炭素源	P & G*	L m**
D-アラゼノース	土	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	-	-
L-イノシトール	--	-
D-マンノース	+	+
D-マンニトール	+	+
α-メリピオース	+	+
β-ラクトース	+	土
ヌルシトール	-	-
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレジトース	+	+
ラフィノース	+	-

- 8 -

レーラムノース	+	+
D-リボース	-	-
L-ソルボース	-	-
D-ソルビトール	-*	-
シクロロース	+	+
D-キシロース	+	+
アドニトール	-	-
ザリシン	土～+	土～+
スターク	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イヌリン	-	-

+: 陽性、土: 暫陽性、-: 貫性

*: プリドハム・ゴットリープの無機培地

**: Inter. J. Syst. Bact. 21: 240-2

47 (1971) によるルエドマンの有機
培地

2) 生育温度範囲: 20 ~ 40°C

3) 脱脂牛乳: ペプトン化および酸乳とともに陽
性

- 9 -

- 4) メラニン様色素の生成: 貫性 (チロシンおよびペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地上)
- 5) スターチの加水分解: 陽性
- 6) セルロースの分解: 貫性
- 7) カゼインの分解: 貫性
- 8) チロシンの分解: 貫性
- 9) セラチンの消化: 貫性
- 10) 硫化水素の生成: 弱い陽性
- 11) 硝酸塩の還元: 陽性
- 12) 生育 pH: pH 5.5 ~ 9.0

上記の通り、本菌 G 367 の特徴としては、基生菌系に指形の胞子のうを着生し、胞子のう中に胞子がたてて一列にならび、胞子に房状の鞭毛を有していることがある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラコス科 (Actinoplanaceae) に属するものであつて、胞子のうが指形で、その中にたてて一列に胞子が形成されるものは、ダクチロスボランジウム属に属する。

さらに、本菌 G 367 株は有機培地上で、基生菌糸が褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクチロスボランジウム・タイランアンセ (Dactylosporangium thailandense) [Arch. Microbiol. 58: 42 ~ 52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌 G 367 を、ダクチロスボランジウム・タイランアンセ G 367 と命名したので、また本菌は工業技術院微生物工学技術研究所に「申請者受理番号第 4840 号」として申請されている。

本発明は上記の知見に基いて完成されたもので、ダクチロスボランジウム属に属する抗生素質ゲンタミシン C1a 生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生素質ゲンタミシン C1a を採取することを特徴とする抗生素質ゲンタミシン C1a の製造法である。

まず本発明を実施するに当り使用されるダクチロスボランジウム属に属する抗生素質ゲンタミシン C1a (以下単に、ゲンタミシン C1a という) の

- 10 -

- 11 -

生産菌としては、上記のダクチロスボランジウム・タイランデンセ G 3 6 7 株がその一例として挙られるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクチロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシン C 1a を製造するに當つて例示すれば、上記のダクチロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好気的に培養することによつて得られる。培地としては、固型培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えはグルコース、シエクロース、マルトース、スター、デキストリン、モラツセなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

— 12 —

例えはコーン・ステア・リカ、大豆粉、穀物粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、ゲンタミシン C 1a を生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましくは 25 ~ 35°C である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常 100 ~ 200 時間程度であつて、ゲンタミシン C 1a が最高活性に達する時期を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシン C 1a 生産菌の液体培養の培養物において、ゲンタミシン C 1a は液体部分に大部分産生されている。

次いでこのゲンタミシン C 1a 生産菌の培養物からゲンタミシン C 1a を採取するのであるが、ゲンタミシン C 1a は水溶性の塩基性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

— 13 —

である。また生産されたゲンタミシン C 1a はバチス・ズアゲリス P C 1 2 1 9 を被検菌として、通常の寒天板法により活性区分の確認、および定量を行なつたものである。

ゲンタミシン C 1a の分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなわちゲンタミシン C 1a 生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形を除去して培養母液を得るのであるが、ゲンタミシン C 1a がアミノ糖化合物であるためにその培養物の pH を一且酸性に調整し、これを中和して酸化してその培養母液を得ることが好ましく、次いでこの培養母液を陽イオン交換樹脂例えはアンペーライト IR C-50 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性物質を 2N アンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を蒸発した後、その pH を調整し、陽イオン交換樹脂例えは CM-セファアツクス C-25 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0 ~ 0.35N の濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性区分を

得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりゲンタミシン C 1a の精製白色粉末を遊離塩基の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシン C 1a は薄層クロマトグラフィーにて单一スポットを示すものであることが簡便に知得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシン C 1a の物理化学的性状を挙れば次の通りである。

分子量

449 (マススペクトルより)

分子式

C₁₀H₈N₆O₄

比旋光度

[(a)]_D²⁵ = +96.2 (C = 0.39, H₂O)

ペーパークロマトグラフィー

クロロホルム:メタノール:17%アンモニア水 (2:1:1) R_f = 0.22

プロパンール:ビリジン:酢酸:水 = (6:4:1:3) 上層液 R_f = 0.29

色性状

— 14 —

白色粉末

上記の性状、さらにマススペクトルの各ピーク、核磁気共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、前記の文献記載のゲンタミシン C_{1a}と同一物質であると同定された。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何んら限定されるものではない。

実施例 1

デキストリン 1%、グルコース 1%、カゼイン水解物 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.1%を含有する培地 (pH 7.0) 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分取し、30°C、20 分間加熱殺菌した。本培地 10 本に、各々タグチロスボランジウム・タイランデンセ G-367 標の斜面培養液よりの一白金耳を移植し、30°C、120 時間振盪培養した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地 20 l を含有する 30 l 容ジャーファーメンターに移植し、30°C、72 時間、300 rpm、毎分 20 l の無菌空気の

- 16 -

特開昭55-156592(6)

条件下で通気攪拌培養した。次いでデキストリン 5%、グルコース 0.5%、脱脂大豆粉 3%、炭酸カルシウム 0.7%、塩化コバルト 1.3 ppm を含有する加熱殺菌した培地 (pH 7.2) 200 l を含有する 250 l 容タンクに上記の培養物 10 l を移植し、30°C、120 時間、250 rpm、毎分 180 l の無菌空気の条件下通気攪拌培養し、培養物約 190 l を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養物よりゲンタミシン C_{1a}を分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養物を、12N 硫酸水溶液にて pH 2 に調整し、30 分間攪拌した後、濃アンモニア水にて pH 7.0 にて調整し、さらにこれに遮蔽剤としてペーライト (商品名) 4 kg を加えて満過し、次いで得られた培養液を、アンペーライト I.R.C.-50 (ローム・アンド・ハース社製) (NH₄⁺型) 10 l を充填したカラムにチャージし、水洗した後、2N アンモニア水 20 l にて溶出せしめ、その全溶出液を得て、これを

- 17 -

100 ml まで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を 6N 硫酸水溶液にて pH 7.0 に調整し、これを、CM-セファアツクス G-25 (フルマシア・ファイン・ケミカル社製) (NH₄⁺型) 500 ml を充填したカラム (径 4 cm) にてチャージして活性物質を吸着せしめた。その後該カラムを水洗後、0 ~ 0.35N の濃度勾配をもたせたアンモニア水 5 ml により溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分画した。各分画について、クロロホルム : メタノール : 28% アンモニア水 = 1 : 1 : 1 の下層を脱脂浴媒とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第 235 分画より 245 分画がゲンタミシン C_{1a}のみを含有したものであつた。次いでこの部分を回収、合せて減圧濃縮し、次いで凍結乾燥してゲンタミシン C_{1a} 85 mg を得た。

特許出願人 東洋醸造株式会社
代表者 伊東富士馬

- 18 -

手 続 準 正 書

昭和 55 年 7 月 1 日

特許庁長官 川原能雄

1. 事件の表示

昭和 54 年特許願第 60021 号

2. 発明の名称

・ 抗生物質ゲンタミシン C_{1a} の製造法

3. 準正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三浦 632 の 1

名称 東洋醸造株式会社

代表者 伊東富士馬

4. 準正命令の日付

自発

5. 準正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 準正の内容

明細書第 4 頁第 16 行の

「diaminopimelic」を
「diaminopimelic」と訂正する



同第18頁第3行の

「セファデックスG」を

「セファデックスC」と訂正する。)